Beiträge zur Analytischen Chemie der Uronsäuren

Inauguraldissertation
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Waldemar Wagner
aus Stein

Amsterdam und Wien
Elsevier Publishing Co.
Springer-Verlag
1963
1962

1966 W 120

Als Dissertation genehmigt

von der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Erlangen - Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung : 28. 11. 1962

Dekan : Univ. - Prof. Dr. H. VOLZ

Berichterstatter : Univ - Prof. Dr. Dr. F. MAY

Berichterstatter : Univ. - Prof. Dr. G. HESSE

Sonderdrucke aus : Analytica Chimica Acta 29, 182 - 189 u. 227 - 239 (1963)

Mikrochimica Acta 1963, 289 - 292

Herrn

DR.-ING. K A R L A N D R E S S ,

Professor für Technische Chemie
an der Universität Erlangen,

und

Herrn

A N T O N F L E C K ,

Regierungs-Oberinspektor
an der Kanzlei der Universität Erlangen,

die dem Verfasser durch ihr persönliches Eintreten den Weg zur Hochschule gebahnt haben,

in Ehrerbietung und Dankbarkeit gewidmet.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Nicht im Handel

Sonderabdruck aus Heft 2, 1963, der

MIKROCHIMICA ACTA

Schriftleitung: *M. K. Zacherl*, Wien

Springer-Verlag in Wien

Alle Rechte vorbehalten

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

Eine einfache Farbreaktion auf Uronsäuren mit o-Aminophenol

Farbreaktionen der Kohlenhydrate in Oxalsäureschmelzen. I

Von

Waldemar Wagner

(Eingegangen am 7. Dezember 1962)

Allgemeines

Zum Nachweis und zur Bestimmung von Kohlenhydraten haben sich weitgehend Farbreaktionen durchgesetzt, da sie gegenüber den Reduktionsmethoden zumeist spezifischer und weniger störanfällig, gegenüber der Darstellung anderer kennzeichnender Derivate (Hydrazone, Osazone usw.) bequemer und schneller sind.

Nach der herrschenden Ansicht handelt es sich bei den hier gemeinten „echten" Farbreaktionen (im Gegensatz zu den nur kolorimetrisch umgestalteten Reduktionsverfahren) in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle um Kondensationen von Furan-2-aldehyd oder dessen Abkömmlingen, die aus den Zuckern unter der Einwirkung von Säuren oder sauren Salzen gebildet werden, mit Phenolen bzw. aromatischen Aminen, wobei über den Reaktionsverlauf im einzelnen noch wenig Sicheres bekannt ist[1].

Im Bereich kleinster Substanzmengen wurden diese Reaktionen bisher entweder gemäß der gewöhnlichen Arbeitstechnik, nur in entsprechend verringertem Maßstab, oder als „Tüpfelreaktionen"[2] ausgeführt, z. B. bei der Ortung und quantitativen Bestimmung chromatographisch oder elektrophoretisch auf Papier oder anderen Trägersubstanzen getrennter Zuckergemische.

Wir haben nun gefunden, daß sich zum mikrochemischen Nachweis von Kohlenhydraten manche der Farbreaktionen sehr zweckmäßig in geschmolzener Oxalsäure durchführen lassen.

Auffallend und wichtig ist, daß dabei durchaus nicht immer die gleichen Farben zu beobachten sind, wie sie bei Anwendung der gebräuchlichen wasserentziehenden Mittel (H_2SO_4, HCl, H_3PO_4, $ZnCl_2$ usw.) im Reagensglas auftreten. Vielfach ist eine reichhaltigere Abstufung von Farbtönen festzustellen; gelegentlich treten beim Erkalten der Schmelze

deutliche Farbumschläge auf. Diese Erscheinungen mögen zum Teil auf die stark reduzierenden Eigenschaften einer solchen Schmelze zurückzuführen sein, während die vorgenannten Wasserabspaltungsmittel in dieser Hinsicht indifferent sind oder oxydierend wirken. Aber auch die verschieden starke kondensierende Wirkung sowie die jeweilige Wasserkonzentration dürften von Belang sein.

Schon bei der Anwendung von Sprühreagenzien in der Papierchromatographie wurden entsprechende Erfahrungen gesammelt. So erlaubt das Reagens von *Buchan* und *Savage* (Anilin + Diphenylamin + H_3PO_4) eine weitgehende Charakterisierung der Zucker auf Papierchromatogrammen[3], während die zugrundeliegenden Farbreaktionen „in flüssiger Phase", nämlich die Pentosen-Reaktion nach *Schiff* und die Ketosen-Reaktion nach *Ihl* und *Pechmann*, lediglich Gruppenreaktionen darstellen. *Geldmacher-Mallinckrodt* erhielt bei ihren Tüpfelreaktionen auf Seidengewebe[4] überraschenderweise mit α-Naphthol die besten Differenzierungen, während dasselbe Reagens bei der allbekannten *Molisch*-Probe nur violette bis purpurrote Farbtöne (Ausnahme: Uronsäuren) liefert. Wiederum ist zu vermerken, daß die auf Papier oder Seide erzielten Anfärbungen nicht durchwegs mit den in der Oxalsäureschmelze erhaltenen übereinstimmen.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der einzelnen Kohlenhydratgruppen mit dem jeweiligen Reagens ist unterschiedlich, so daß man durch geeignete Wahl von Temperatur und Erhitzungsdauer weniger reaktionsfähige Gruppen ausschalten kann. Vielfach hängt auch der Farbton vom Wert dieser Veränderlichen ab. Es ist daher wichtig, für gleichbleibende Temperatur zu sorgen, was am besten in einem elektrischen Trockenschrank erreicht wird.

---

o-Aminophenol, einer der einfachsten aromatischen Körper mit beiden für Farbreaktionen der Zucker bedeutsamen funktionellen Gruppen, läßt sich mit Kohlenhydraten nicht in wäßriger Lösung, sondern bisher nur auf Papier[5] oder in der Oxalsäureschmelze zur Umsetzung bringen. In diesem Falle ist es von Vorteil, wenn die Reaktion gemildert wird, z. B. durch Zusatz von Pimelinsäure. Nur Uronsäuren geben unter diesen Bedingungen violette bis blaue Farbtöne. Bemerkenswert ist, daß (im Gegensatz zur Tollensschen Naphthoresorcin-Reaktion) Ascorbinsäure hier nicht stört.

Arbeitsvorschrift

Reagenzien

1. o-Aminophenol puriss. (2,5%) in Alkohol : Aceton (1 : 1). Die Lösung ist einige Tage haltbar, wenn sie vor Licht geschützt in der Kälte aufbewahrt wird.
2. Oxalsäure : Pimelinsäure (2 : 1), feingepulvertes Gemisch.
3. Amylalkohol.

Ausführung

In einen kleinen Porzellantiegel bringt man einen Tropfen der Probelösung, dann das gleiche Volumen o-Aminophenol-Reagens, vermischt und gibt schließlich soviel vom Oxalsäure-Pimelinsäure-Gemisch hinzu, daß ein dickflüssiger Brei entsteht. Der Tiegel wird im Trockenschrank 10 Minuten lang bei 120° C gehalten. Nach dem Abkühlen löst man den Schmelzkuchen in etwa 3 ml Wasser und beurteilt den Farbton der wäßrigen Lösung. Ein Teil davon wird (unter Umständen nach weiterer Verdünnung) mit etwas Amylalkohol vorsichtig ausgeschüttelt. Nach Klärung stellt man die Färbung der Alkoholschicht fest.

Ergebnisse

Mit je 100 μg der wichtigsten natürlich vorkommenden Zucker und ihrer Abkömmlinge wurden die folgenden Farben erhalten:

Tabelle 1

Substanz	Wäßrige Lösung	Alkoholische Lösung
(Blindprobe)	farblos	farblos
Glukuronsäure*	blauviolett → rotviolett	blau
Mannuronsäure*	blauviolett → rotviolett	blau
Galakturonsäure	blauviolett → rotviolett	blau
Arabinose	fast farblos	schwach grau
Xylose	schwach graubraun	hellgrau
Ribose	graubraun	bräunlich grau
Desoxyribose	fast farblos	schwach gelblich
Rhamnose	schwach gelb	gelb
Fucose	fast farblos	schwach gelblich
Glukose	fast farblos	schwach gelblich
Mannose	fast farblos	schwach gelblich
Galaktose	fast farblos	schwach gelblich
Fructose	schwach gelb	gelb
Sorbose	schwach gelb	gelb
Sedoheptulose**	fast farblos	schwach gelblich
Ascorbinsäure	farblos	farblos
Saccharose	schwach gelb	gelb
Maltose	farblos	fast farblos
Lactose	schwach gelblich	gelblich
Glukosamin***	farblos	fast farblos
N-Acetyl-glukosamin	farblos	fast farblos
Galaktosamin***	farblos	fast farblos
Sorbit	farblos	fast farblos
Mannit	farblos	fast farblos
Dulcit	farblos	fast farblos
Inosit	farblos	fast farblos

* Als Lacton.
** Als krist. Anhydrid.
*** Als Hydrochlorid.

Erfassungsgrenze: 1 μg Uronsäure in 10 μl Wasser lieferte noch eine deutliche Reaktion (blaßviolette Schmelze; bläuliche Amylalkoholschicht).

Grenzkonzentration: 1 : 10000.

Bemerkungen

1. Die Reaktion gelingt am besten mit etwa 50 μg Substanz; mehr als 100 μg Kohlenhydrate sollen nicht vorhanden sein. Bei sehr geringen Substanzmengen ($<$ 20 μg) hält man das Reaktionsgemisch dünnflüssiger und verwendet zum Lösen der Schmelze bzw. zum Ausschütteln weniger Flüssigkeit.

2. Die Farbe der Schmelze ist gewöhnlich weniger charakteristisch als die der wäßrigen Lösung; dies gilt jedoch nicht für sehr kleine Proben.

3. In wäßriger Lösung verblassen die Farben verhältnismäßig rasch; viel länger haltbar sind sie in der Amylalkoholphase. Der aus Uronsäuren gebildete blauviolette Farbstoff schlägt in wäßriger Lösung alsbald nach rotviolett um.

4. Wird das Ausschütteln mit Amylalkohol zu heftig vorgenommen, so entstehen einige Zeit stabile Emulsionen; zarte Farbtöne werden dadurch beeinträchtigt oder verschwinden ganz.

Zusammenfassung

Uronsäuren bilden mit o-Aminophenol in der Oxalsäure-Pimelinsäure-Schmelze einen blauvioletten Farbstoff unbekannter Konstitution, der aus der wäßrigen Lösung der Schmelze mit Amylalkohol ausgeschüttelt werden kann. Diese empfindliche Reaktion kann zum qualitativen Nachweis der Uronsäuren dienen.

Summary

Uronic acids give a blue-violet coloring matter of unknown constitution in the melt of oxalic acid and pimelic acid on treatment with *o*-aminophenol. This colored product can be extracted from the aqueous solution of the melt by shaking with amyl alcohol. This sensitive reaction may be employed for the qualitative detection of uronic acid.

Résumé

Les acides uroniques forment avec l'*o*-aminophénol dans le fondu d'acide oxalique-acide pimélique, une matière colorée, bleu-violette, de constitution inconnue, que l'on peut extraire par l'alcool amylique en agitant la solution aqueuse de la masse fondue. Cette réaction sensible peut servir à la recherche qualitative des acides uroniques.

Literatur

[1] *F. H. Newth*, Adv. Carbohydr. Chem. **6**, 98 (1951).

[2] *F. Feigl*, Tüpfelanalyse, Bd. II, 4. Aufl., Frankfurt a. M.: Akademische Verlagsges. 1960. S. 393ff.

[3] *J. L. Buchan* und *R. I. Savage*, Analyst **77**, 401 (1952).

[4] *M. Geldmacher-Mallinckrodt*, Biochem. Z. **324**, 186 (1953).

[5] *S. Hirase*, *C. Araki* und *S. Nakanishi*, Bull. Chem. Soc. Japan **26**, 183 (1953).

Printed in Austria

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536528_0062

Reprinted from
Analytica Chimica Acta
Elsevier Publishing Company, Amsterdam
Printed in The Netherlands

STUDIEN ÜBER DIE NAPHTHORESORCIN-REAKTION VON TOLLENS

I. GRUNDSÄTZLICHES ZUR AUSFÜHRUNG UND BEURTEILUNG DER REAKTION

WALDEMAR WAGNER

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen (Deutschland)

(Eingegangen den 1. Januar, 1963)

Die meistbenutzte Reaktion zur Erkennung wie auch zur mengenmässigen Erfassung von Uronsäuren ist die von BERNHARD TOLLENS vor über fünfzig Jahren aufgefundene und nach ihm benannte Naphthoresorcin*-Reaktion[1,2]. Sie ist in der Folgezeit sehr viel untersucht und abgeändert worden mit dem Ziel, die Probe empfindlicher und spezifischer zu gestalten (siehe[3,31]). Wesentliche Verbesserungen stammen besonders von CARL NEUBERG und seinen Schülern.

Natürlich hat es nicht an Versuchen gefehlt, die NR-Reaktion für quantitative Zwecke auszugestalten. Schon im Jahre 1909 zeigte C. TOLLENS, dass mit ihrer Hilfe eine ungefähre Bestimmung der Glukuronsäure im Harn möglich ist[5]. Diese Erfahrung blieb unverständlicherweise volle 25 Jahre unbeachtet! Erst 1935 wurde sie von SALT bestätigt[6]; seine Bemühungen um eine genaue Methode waren jedoch erfolglos. Dasselbe gilt für Versuche von VON FÜRTH UND PESCHEK, die auf der Suche nach einer Mikrobestimmung für Uronsäuren die NR-Reaktion wegen ihrer „Launenhaftigkeit" alsbald angeschlossen haben[7]. FLORKIN konnte 1937 erstmals über günstige Ergebnisse bei reinen Uronsäuren bzw. ihren Salzen berichten[8]; und wiederum ein Jahr später veröffentlichten MAUGHAN *et al.* ein für quantitative Reihenanalysen brauchbares Verfahren unter Verwendung einer wässrigen NR-Lösung[9].

Nun setzt eine Fülle von Arbeiten ein [10–45], die sich mit der kolorimetrischen Bestimmung von Uronsäuren teils in reinen Lösungen, teils in biologischen Flüssigkeiten befassen. Sie sollen hier jedoch nicht im einzelnen besprochen werden.

Schwierigkeiten und Fehlerquellen

Immer wieder wird in der biochemischen Literatur Klage geführt, dass die NR-Reaktion einen „launischen Charakter" aufweist, vor allem bei unzweifelhafter Anwesenheit von Uronsäuren häufig negativ ausfällt[3,4,7,31,46]. Die Gründe hierfür sind verschiedener Art. Wiederum hat sich NEUBERG um ihre Aufhellung besonders verdient gemacht.

(*I*) Versagen der qualitativen Reaktion trotz Anwesenheit von Uronsäuren bzw. zu niedrige Werte bei der Bestimmung:

(*1*) *Mangelhafte Hydrolyse von Uronosiden und Polyuronosiden.* Viele glykosidische Bindungen, an denen Uronsäuren beteiligt sind, werden mit Säure verhaltnismässig schwer aufgespalten. Dies gilt insbesondere für die hochmolekularen Stoffe Pektin,

* Im folgenden stets abgekürtzt als NR.

Pektinsäure, Alginsäure, Hyaluronsäure, Heparin, *usw.* Einer Verschärfung der Hydrolysebedingungen steht aber der Umstand entgegen, dass Uronsäuren bei Gegenwart von Mineralsäure in der Hitze CO_2-Abspaltung erfahren, wodurch sich kleine Mengen dem Nachweis entziehen können. Niedermolekulare Glykoside dürften aber in jedem Falle für die qualitative Probe genügend schnell aufgespalten werden, obwohl im einzelnen beträchtliche Unterschiede bestehen (*vgl.*[52]); bei quantitativen Bestimmungen ist auf schwer hydrolysierbares Material unbedingt zu achten!

HEYNS UND KELCH[30] verfolgten den Hydrolysenverlauf von Phenol-β-D-glukuronosid unter den Bedingungen ihrer quantitativen Methodik (4 *N* HCl; 100°; 30 Min Erhitzungszeit) und stellten durch Bestimmung des freigemachten Phenols fest, dass nur 89.6% des eingesetzten Uronosids aufgespalten war. Ähnliche Erfahrungen sammelten HANSON *et al.*[18] mit *o*-Aminophenol-β-D-glukuronosid.

(*2*) *Decarboxylierung.* Beim Erhitzen mit starken Säuren auf 100 bis 120° werden die Uronsäuren decarboxyliert und gehen in Pentosen über, worauf TOLLENS UND LEFÈVRE bereits 1907 ein recht brauchbares Bestimmungsverfahren aufgebaut haben. Unbegreiflicherweise blieb diese Fehlerquelle lange Zeit unbeachtet, bis HEYNS UND KELCH[30] neuerlich zeigten, dass unter den üblichen quantitativen Reaktionsbedingungen (4 *N* HCl; 100°) nach halbstündigem Erhitzen ohne NR nur noch 86% der ursprünglichen Glukuronsäuremenge wiedergefunden werden! Wenn auch der Verlust durch Decarboxylierung bei der Anstellung der NR-Reaktion nicht dieses Ausmass erreicht, indem ja durch Farbstoffbildung laufend die (von Anfang an vorhandene oder im Hydrolysenverlauf neu gebildete) freie Uronsäure festgelegt wird, so können doch die Ergebnisse beträchtlich verfälscht werden. TEAGUE[34] vertritt deshalb *u.E.* mit Recht die Ansicht, dass alle Bestimmungen von Glukuronosiden, bei denen Glukuron und nicht das betr. Uronosid selbst zur Aufstellung der Eichkurve gedient hat, keine genauen Werte ergeben haben. In ähnlichem Sinne äusserten sich auch DEICHMANN UND DIERKER[21].

(*3*) *Beschlagnahme des NR durch Nebenreaktionen und Begleitsubstanzen.* (*a*) *Reaktion mit anderen Carbonylverbindungen.* Bei Anwesenheit Carbonylgruppen-haltiger Begleitstoffe kann das NR-Reagens in mehr oder weniger grossem Ausmass abgefangen werden, sodass es für die Umsetzung mit den Uronsäuren nicht mehr in ausreichendem Masse zur Verfügung steht. (*b*) *Selbstkondensation des NR.* Kleine Mengen NR werden durch die Bildung eines intensiv grün fluoreszierenden Farbstoffes (*vgl.* Nebenreaktionen, S. 187) der gewünschten Umsetzung entzogen. Sehr wahrscheinlich handelt es sich um eine Selbstkondensation unter den Bedingungen der TOLLENS-Reaktion, die naturgemäss nicht verhindert werden kann. (*c*) *Farbstoffbildung im Licht.* Eine Verringerung der NR-Konzentration als Folge von Lichteinwirkung wird dadurch mehr als wettgemacht, dass der hierbei entstehende rote Farbstoff (*vgl.* Nebenreaktionen, S. 186) im Messbereich um 570 mμ stark absorbiert. Es wird sich also der Einfluss im entgegengesetzten Sinne wie unter (*a*) und (*b*) geltend machen.

(*4*) *Verharzung bzw. Adsorption des gebildeten Farbstoffes.* Der aus NR und Uronsäure entstehende Farbstoff ist in wässrigem Medium unlöslich und scheidet sich gewöhnlich in Form von graublauen Flocken ab. Manchmal kommt es indessen zur Bildung harziger Schmieren und Krusten, an deren Aufbau ausser dem Farbstoff noch überschüssiges NR und etwaige sonstige Begleitstoffe mehr oder weniger stark beteiligt sind. Solche hochmolekularen Körper lösen sich nur noch unvollkommen oder

überhaupt nicht mehr in den vorgeschriebenen Extraktionsmitteln, sodass auch eingeschlossener oder adsorbierter unverharzter Farbstoff nicht mehr in Erscheinung tritt. Enthält die Probe nur wenig Uronsäure, dann kann die NR-Reaktion aus diesen Gründen völlig versagen.

(5) *Leicht kondensierendes Aglykon.* Bei Phenol-uronosiden kann es auch dadurch zu Störungen kommen, dass das Aglykon unter den Reaktionsbedingungen anstelle des NR mit der freigesetzten Uronsäure einen Farbstoff bildet. Dies ist beschrieben für die Glukuronsäurepaarlinge des *p*-Kresols[47], α- und β-Naphthols[48] *u.a.*

(*II*) Scheinbar positive Reaktion bei Abwesenheit von Uronsäuren bzw. zu hohe Werte bei der Bestimmung:

(1) *Störende Carbonyl-carbonsäuren.* Farbstoffe von gleicher oder doch sehr ähnlicher Lichtabsorption geben: Glyoxylsäure (und Abkömmlinge derselben wie Allantoin), Askorbinsäure, Mesoxalsäure (und Abkömmlinge derselben wie Alloxan) sowie Hydroxy-carbonyl-carbonsäuren, wie Hydroxy-brenztraubensäure, *usw.*

(2) *Anwesenheit anderer Kohlenhydrate.* Liegen grössere Mengen von sonstigen Kohlenhydraten vor, so können Fehlschlüsse und zweifelhafte Ausfälle bei der qualitativen Probe die Folge sein; bei der quantitativen Bestimmung werden fast durchweg zu hohe Werte vorgetäuscht (näheres siehe[52]!).

(3) *Zersetztes NR-Reagens.* Eine wässrige oder alkoholische NR-Lösung färbt sich allmählich gelb → orange → rot, besonders schnell dann, wenn Licht und Sauerstoff einwirken können. Aber auch nach Ausschaltung dieser Einflüsse tritt langsame Zersetzung ein. Der gebildete Farbstoff lässt sich leicht ausziehen, sogar mit Benzol oder Toluol, und da er bei 570 mμ eine beträchtliche Absorption aufweist (*vgl.* S. 187), hat er vielfach zu Irrtümern und Fehlern Anlass gegeben.

Über die Problematik des NR-Reagenses siehe den folgenden Abschnitt.

Reagentien und Nebenreaktionen

(*I*) *Naphthoresorcin-Reagens.* Von wesentlicher Bedeutung für die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der TOLLENSschen Reaktion erweist sich die Anwendungsform des NR. Um die Verschiedenartigkeit und Unsicherheit der hier herrschenden Ansichten und Befunde aufzuzeigen, lässt es sich nicht vermeiden, eine gedrängte Darstellung dieser Problematik zu geben.

B. TOLLENS hat in seiner ersten Mitteilung[2] über seinen neuen Uronsäurenachweis ein *alkoholisches NR-Reagens* angegeben, das auch von C. TOLLENS für die erste halbquantitative Ausführungsform[5] übernommen wurde. Im NEUBERGschen Laboratorium ist aber bald die grosse Zersetzlichkeit von alkoholischen NR-Lösungen bemerkt worden; NEUBERG empfiehlt daher, bei Anstellung der qualitativen Probe *festes NR* zuzusetzen. Das erste brauchbare, wenn auch umständliche, quantitative Verfahren von FLORKIN verwendet eine Lösung von *NR in Aceton*[8].

MAUGHAN *et al.*[9] haben schliesslich eine *wässrige* Reagenslösung vorgeschlagen auf Grund der Beobachtung, dass umso mehr Farbstoff gebildet werd, je geringer die Alkoholkonzentration im Reaktionsgemisch ist. Sie stabilisieren die 0.2%ige Lösung in dest. Wasser durch 24-stündiges Erwärmen auf etwa 38° im verschlossenen Gefäss. Nach Filtration soll dann das Reagens etwa einen Monat stabil sein, wenn es bei 3–5° im Dunkeln aufbewahrt wird.

Ähnlich erwärmen HANSON *et al.*[18] die wässrige Lösung eine Stunde lang auf 37° und lagern sie dann lichtgeschützt bei 0°. Dieses Reagens soll etwa eine Woche haltbar sein.

STARY UND YUVANIDIS[32] endlich „erhitzen" die Lösung von NR in Wasser eine Min (Temperatur ist nicht angegeben) und finden, dass sie nur 24 Stunden brauchbar ist.

Der Sinn dieser Wärmebehandlung wurde von JARRIGE[23] so gedeutet, dass sich „ein bestimmtes Gleichgewicht zwischen NR und seinem Oxydationsprodukt" in der wässrigen Lösung einstellt. Eine Begründung für diese absonderliche Annahme führt er jedoch nicht an. Man kann sich nicht vorstellen, wie im dest. Wasser, *z.T.* sogar unter Luftabschluss eine Oxydation stattfinden soll. Doch wurde dieser Gedanke aufgegriffen, und wenig später erschien eine Arbeit von BISSET *et al.*[24], welche die Farbstoffbildung „irgendeinem instabilen Oxydationsprodukt des NRs" zuschreiben, ohne allerdings Belege hierfür beibringen zu können. Es wird lediglich angeführt, dass es sich nach ihren Befunden nicht um 3-Hydroxy-naphthochinon-(1.4) handeln könne, was aber nahezu selbstverständlich ist, da die Einführung einer neuen Sauerstoff-funktion durch blosse Alterung einer wässrigen NR-Lösung wohl nur wenig Wahrscheinlichkeit für sich hat. Überdies kann man 3-Hydroxy-naphthochinon-(1.4) („Naphthalinsäure") nicht als instabil bezeichnen; es stellt eine seit langem bekannte, durchaus beständige Verbindung dar.

Nach den Erfahrungen von BISSET *et al.* lassen sich die mit den unkontrollierbaren Alterungsvorgängen in der wässrigen Reagenslösung verbundenen Fehlerquellen vermeiden, wenn eine „künstliche Alterung" des NR mit einem schwachen Oxydationsmittel während der Farbentwicklung durchgeführt wird; als solches habe sich $H_3[Fe(CN)_6]$ bewährt. Wie man den Angaben im Original entnehmen kann, trifft auf 1 Mol NR nur 0.1 Mol Oxydationsmittel, sodass an eine stöchiometrische Redox-Reaktion nicht zu denken ist. Nun vermag die Hexacyano-eisen(III)-säure in der stark salzsauren Lösung zwar schwach oxydierend zu wirken[49]; man muss jedoch erwarten, dass bei unmittelbarer Zugabe der $H_3[Fe(CN)_6]$ zum Reaktionsgemisch (noch dazu vor dem Zusatz des NR) vor allem die leicht oxydierbare Aldehydgruppe der Uronsäure angegriffen wird. In der genannten Arbeit sind leider keine Beleganalysen angegeben, sodass eine wirkliche Beurteilung dieser „Oxydationsmethode" nicht möglich ist.

Schon vordem wollen übrigens MEYER *et al.*[15] durch Zusatz von Kalium-peroxydisulfat, $K_2S_2O_8$, erhöhte Farbintensitäten bei der quantitativen Bestimmung erzielt haben. Nachdem leider Beleganalysen auch hier fehlen, ja nicht einmal das Verfahren beschrieben wird, ist eine Stellungnahme zu dieser Angabe ausgeschlossen.

Der letzte Vorschlag in dieser Reihe stammt von SMITH[50], der ebenfalls die Alterung des wässrigen NR-Reagenses für einen Oxydationsvorgang erklärt und das Oxydationsprodukt für die Farbstoffbildung verantwortlich macht, wiederum ohne jeglichen Anhaltspunkt. Er bereitet das Reagens, indem er durch die wässrige Lösung von NR eine Stunde lang Sauerstoff leitet und den „Überschuss" an letzterem nach 24 Stunden mit Stickstoff verdrängt. Diese Variante wurde von den meisten neueren Bearbeitern übernommen, *u.a.* von HEYNS UND KELCH[30].

Im Gegensatz zu allen übrigen Bearbeitern verzichteten FUCHS UND TRAUNER-ADELPOLLER[22] auf jegliche Vorbehandlung; das Reagens wurde unmittelbar vor Gebrauch durch einfaches Auflösen in Wasser hergestellt. Auch in der sorgfältigen Arbeit von FISHMAN UND GREEN[38] fand eine täglich frisch bereitete, wässrige NR-Lösung ohne weitere Zusätze und ohne Alterungsprozess Verwendung.

Wir haben aus verschiedenen Gründen, die später[52] näher dargelegt werden, einer Lösung von *NR in Eisessig* den Vorzug gegeben. Solche Lösungen sind relativ stabil, auch ohne eine der oben erwähnten Vorbehandlungen; selbst nach wochenlangem

Aufbewahren bei Raumtemperatur im Dunklen lieferten sie mit reinen Uronsäuren zufriedenstellende Ergebnisse. Anders jedoch, wenn noch weitere Zucker anwesend sind; in diesen Fällen haben aus unbekannten Gründen stets die Versuche mit frisch bereiteten NR-Lösungen die geringsten Abweichungen aufzuweisen. Vergleichsweise wurde entsprechend der Vorschrift von MAUGHAN *et al.* das frisch bereitete Reagens 24 Stunden bei 38° gehalten. Dadurch traten aber keine charakteristischen Veränderungen gegenüber der nicht vorbehandelten Eisessiglösung des NR auf; insbesondere waren die Farbintensitäten nicht erhöht.

(*II*) *Nebenreaktionen.* Bei der TOLLENSschen Reaktion arbeitet man stets mit einem grossen Überschuss an NR, einmal um die Bildung des violetten Farbstoffes mit den Uronsäuren möglichst zu beschleunigen, zum andern um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass das NR durch eine Anzahl von Nebenreaktionen der gewünschten Umsetzung entzogen werden kann. Diese in anderem Zusammenhang meist schon erwähnten Nebenreaktionen zerfallen in drei Klassen, von denen die letzte noch etwas eingehender zu behandeln ist: (*1*) Umsetzungen mit störenden Carbonyl-carbonsäuren, *usw.*; (*2*) Umsetzungen mit anderen Carbonyl-verbindungen; (*3*) Farbstoffbildung.

Farbstoffbildung durch Belichtung

Die Bildung eines stark störenden, gelbroten bis roten Farbstoffes durch Zersetzung alkoholischer NR-Lösungen am Licht wurde zuerst von NEUBERG beschrieben. Nach unserer Auffassung dürften die meisten positiven Fehldeutungen der TOLLENSschen Reaktion auf diese Ursache zurückzuführen sein; denn der mit Benzol und Chloroform, erst recht natürlich mit Äther oder Amylalkohol extrahierbare Farbstoff entsteht auch in wässriger NR-Lösung und bei Belichtung von festem NR, dagegen kaum in einer Eisessiglösung dieses Reagenses.

Lässt man eine frische, 0.2%ige, wässrige NR-Lösung in einem Gefäss aus gewöhnlichem Glase bei Raumtemperatur stehen, so überrascht die Schnelligkeit, mit der selbst zerstreutes Tageslicht einwirkt: Schon nach einer Stunde hat sich der zunächst gelbliche Farbton deutlich vertieft; nach eintägigem Stehen ist die Lösung goldgelb, und am vierten Tage bereits fallen aus der tief rotorangefarbenen Lösung braunviolette Partikel aus. Die gleichen Erscheinungen, nur in verzögerter Folge, beobachtet man bei der Alterung unter Lichtausschluss; es besteht also in dieser Beziehung kein grundsätzlicher Unterschied.

Nachdem der braunviolette Körper (im folgenden als „Farbstoff NR-Z" bezeichnet) offenbar die Endstufe des Zersetzungsprozesses darstellt und auf Grund seiner Färbung der stärkste störende Einfluss auf die TOLLENS-Reaktion zu erwarten ist, wurde er etwas genauer untersucht.

Der im Verlauf der nächsten Tage gebildete Niederschlag wurde abzentrifugiert, mehrfach mit Wasser ausgewaschen und getrocknet. Man erhält ein violettbraunes Pulver, dessen Löslichkeitsverhältnisse in Tabelle I zusammengestellt sind.

Ein Vergleich mit dem aus Uronsäuren + NR erhaltenen Farbstoff lehrt, dass von einer Identität beider Körper, wie sie TEAGUE[34] postuliert hat, nicht die Rede sein kann. Ihre grundsätzliche Verschiedenheit geht klar aus dem Absorptionsspektrum (Fig. 1) hervor, das für den Uronsäurefarbstoff eine höchst charakteristische Bande mit dem Maximum bei 565 mμ aufweist, für den Farbstoff NR-Z dagegen ein wenig ausgeprägtes Maximum bei ~ 510 mμ. Bedeutsam ist auch der Verlauf der Extinktionskurven im violetten und nahen ultravioletten Gebiet.

Die Darstellung veranschaulicht ferner die erhebliche Absorption des störenden Farbstoffes NR-Z im Messbereich von 560–570 mμ.

TABELLE I

LÖSLICHKEITSVERHÄLTNISSE

Lösungsmittel	*Farbstoff NR-Z*		*Farbstoff aus Uronsäure + NR*	
	Löslichkeit	*Farbe der Lösung*	*Löslichkeit*	*Farbe der Lösung*
Wasser	Unlösl.	—	Unlösl.	—
Äthanol	Leicht lösl.	Rosa	Lösl.	Blau
Eisessig	Leicht lösl.	Rosa	Lösl.	Blau
Äthylacetat	Leicht lösl.	Tiefrosa	Lösl.	Rotviolett
Aceton	Leicht lösl.	Rosa	Lösl.	Rotviolett
Äther	Schwer lösl.	Rosa	Leicht lösl.	Violett[a]
Chloroform	Schwer lösl.	Rosa	Lösl.	Violett[a]
Toluol	Sehr schwer lösl.	Schwach rosa	Lösl.	Violett[a]
Toluol/Eisessig 4 : 1	Schwer lösl.	Rosa	Lösl.	Violett[a]

[a] Farbe der organischen Phase nach Extraktion des Farbstoffes aus dem Reaktionsgemisch.

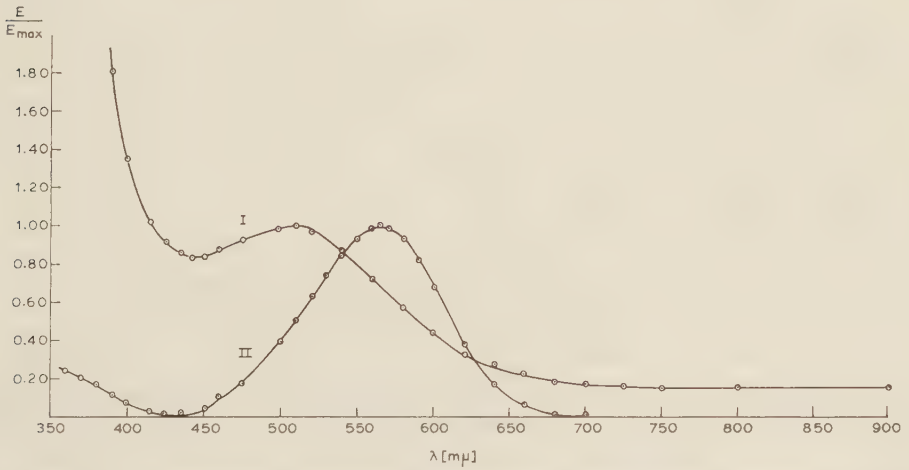

Fig. 1. $E/E_{max} = f(\lambda)$ für den Farbstoff NR-Z (I) und für den Farbstoff aus Uronsäure + NR (II).

Farbstoffbildung beim Erhitzen

Schon nach kurzem Erhitzen des Reaktionsgemisches[52] im Wasserbad, bevor noch wahrnehmbare Mengen des Uronsäurefarbstoffes entstanden sind, zeigt die Lösung eine prächtige grüne Fluoreszenz zunehmender Intensität, die auch neben dem später hervortretenden Uronsäurefarbstoff deutlich sichtbar ist. Beim Extraktionsvorgang tritt sie nicht in die Toluolphase über. TOLLENS UND RORIVE[1] haben diese Erscheinung in ihren ersten Versuchen mit NR schon beobachtet, erachten sie aber als spezifisch für die Anwesenheit von Pentosen oder Methylpentosen, was nach unseren Erfahrungen nicht stimmen kann; denn sie macht sich bei den Uronsäure-haltigen Proben wie bei den Leerwerten in der gleichen Weise geltend. Unter diesen Umständen sowie in Anbetracht der Leichtigkeit, mit der sich der fluoreszierende Farbstoff bildet, wird man an eine Selbstkondensation des NR denken müssen, wie sie vom Resorcin seit langer Zeit bekannt ist[51].

Farbstoffbildung durch Alterung der Reagenslösungen

Selbst unter Lichtabschluss ist das wässrige NR-Reagens sehr instabil und nur begrenzte Zeit verwendungsfähig. Wieweit in letzterem Punkte die Meinungen auseinandergehen, wurde im S. 184 bereits ausgeführt.

Beim Aufbewahren einer 0.2%igen Lösung von NR in reinstem Eissesig machen sich im Gegensatz zur wässrigen Lösung nur langsam Alterungsvorgänge bemerklich. Die frisch bereitete, eben wahrnehmbar beigefarbene Lösung zeigt nach achtwöchiger Lagerung im Dunkeln bei Raumtemperatur einen gelblichen Farbton. Wie ein Vergleich der beiden Extinktionskurven (Fig. 2) lehrt, hat am violetten Ende des Spektrums eine Verschiebung der Absorption nach längeren Wellen hin stattgefunden; im übrigen Bereich ist die Extinktion etwa im gleichen Verhältnis erhöht.

Es ergeben sich demnach keine Anhaltspunkte für die Bildung eines typischen Farbstoffes bei der Alterung einer NR-Lösung in Eisessig über mehrere Wochen.

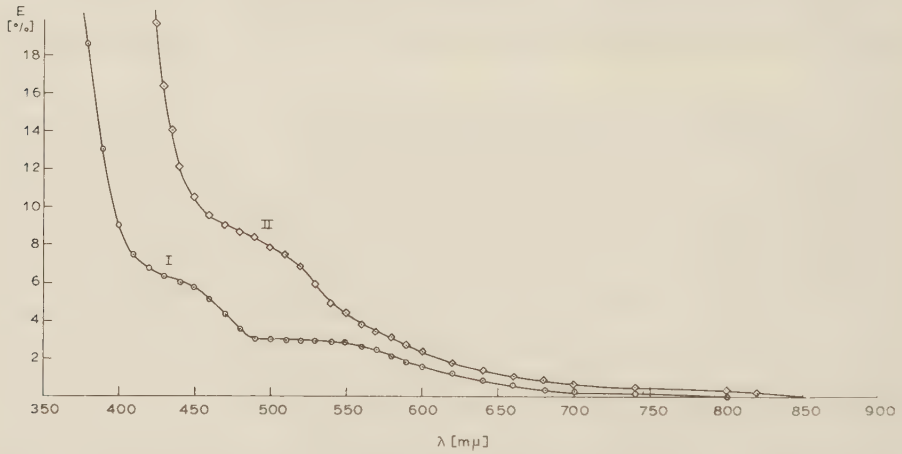

Fig. 2. $E = f(\lambda)$ für eine frisch bereitete (I) und für eine acht Wochen alte (II) NR-Lösung in Eisessig (0.2%).

ZUSAMMENFASSUNG

Die bei der Tollensschen Naphthoresorcin-Reaktion auftretenden Schwierigkeiten und Fehlerquellen werden zusammengestellt und besprochen. Als Reagens empfiehlt sich eine Lösung von Naphthoresorcin in Eisessig, welche an Haltbarkeit alle bisher vorgeschlagenen Lösungen in Wasser, Alkohol, *usw.* übertrifft. Es wird gezeigt, dass der im Verlauf der Alterung wässriger Naphthoresorcin Lösungen gebildete Farbstoff nicht mit dem aus Uronsäuren und Naphthoresorcin entstehenden identisch ist.

SUMMARY

Difficulties and sources of error which occur in Tollens' reaction are discussed. The reagent is best prepared by dissolving naphthoresorcinol in glacial acetic acid; such reagent solutions are more stable than those in water or ethanol. It is shown that the dyes formed by ageing aqueous naphthoresorcinol solutions and by the reaction of naphthoresorcinol with uronic acids are not identical.

RÉSUMÉ

L'auteur a fait une étude sur les difficultés et les sources d'erreurs possibles de la réaction de Tollens. Il est préférable de dissoudre le naphtorésorcinol dans l'acide acétique; une telle solu-

tion est plus stable qu'une solution aqueuse ou alcoolique. D'autre part, on constate que les colorants formés par action de solutions de naphtorésorcinol dans l'eau ne sont pas identiques à ceux formés par la réaction du naphtorésorcinol avec des acides uroniques.

LITERATUR

1 B. Tollens und F. Rorive, *Chem. Ber.*, 41 (1908) 1783.
2 B. Tollens, *Chem. Ber.*, 41 (1908) 1788.
3 C. Neuberg und M. Kobel, *Biochem. Z.*, 243 (1931) 435.
4 F. Ehrlich, in G. Klein (Ed.), *Handb. d. Pflanzenanalyse*, Bd. III/1, Springer-Verlag, Wien, 1932, S. 115 f.
5 C. Tollens, *Z. Physiol. Chem.*, 61 (1909) 95.
6 H. B. Salt, *Biochem. J.*, 29 (1935) 2705.
7 O. von Fürth und K. Peschek, *Biochem. Z.*, 287 (1936) 365.
8 M. Florkin, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 126 (1937) 916.
9 G. B. Maughan, K. A. Evelyn und J. S. L. Browne, *J. Biol. Chem.*, 126 (1938) 567.
10 M. Florkin und R. Crismer, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 131 (1939) 1277; R. Crismer, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 132 (1939) 481.
11 E. M. Kapp, *J. Biol. Chem.*, 134 (1940) 143.
12 W. Mozolowski, *Biochem. J.*, 34 (1940) 823.
13 G. J. Fashena und H. A. Stiff, *J. Biol. Chem.*, 137 (1941) 21.
14 M. Florkin *et al.*, *Enzymologia*, 10 (1941/42) 220.
15 K. Meyer, H. S. Bloch und E. Chaffee, *Federation Proc.*, 1 (1942) 125.
16 H. D. Ratish und J. G. M. Bullowa, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2 (1943) 381.
17 W. Deichmann, *J. Lab. Clin. Med.*, 28 (1943) 770.
18 S. W. F. Hanson, G. T. Mills und R. T. Williams, *Biochem. J.*, 38 (1944) 274.
19 D. D. Dziewiatkowski und H. B. Lewis, *J. Biol. Chem.*, 158 (1945) 77.
20 G. T. Mills, *Biochem. J.*, 40 (1946) 283.
21 W. B. Deichmann und M. Dierker, *J. Biol. Chem.*, 163 (1946) 753.
22 L. Fuchs und J. Trauner–Adelpoller, *Oesterr. Chemiker-Ztg.*, 48 (1947) 180.
23 P. Jarrige, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 29 (1947) 461.
24 N. G. Bisset, B. W. L. Brooksbank und G. A. D. Haslewood, *Biochem. J.*, 42 (1948) 366.
25 M. F. Jayle, O. Crépy und F. Meslin, *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 10 (1949) 145.
26 P. Jarrige, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 32 (1950) 1031.
27 W. H. Fishman *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 30 (1951) 685.
28 Z. I. Kertesz, *The Pectic Substances*, Interscience, New York, 1951, S. 41.
29 H. G. Bray, *et al.*, *Biochem. J.*, 52 (1952) 412.
30 K. Heyns und C. Kelch, *Z. Anal. Chem.*, 139 (1953) 339.
31 A. Grauer und C. Neuberg, *Anal. Chim. Acta*, 8 (1953) 422.
32 Z. Stary und M. Yuvanidis, *Biochem. Z.*, 324 (1953) 206.
33 F. Fretwurst und H. A. Ahlhelm, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, 217 (1953) 382.
34 R. S. Teague, *Advan. Carbohydrate Chem.*, 9 (1954) 185.
35 S. Hollmann, *Z. Physiol. Chem.*, 298 (1954) 77.
36 H. G. Bray und W. V. Thorpe, *Methods Biochem. Anal.*, 1 (1954) 27.
37 Z. Dische, *Methods Biochem. Anal.*, 2 (1955) 313.
38 W. H. Fishman und S. Green, *J. Biol. Chem.*, 215 (1955) 527.
39 K. Heyns, in Hoppe-Seyler/Thierfelder (Eds.), *Handb. d. physiol. -u. pathol.-chem. Analyse*, 10. Auflage, Bd. III/1, Springer-Verlag, Berlin, 1955, S. 866 ff.
40 K. Ponse, O. Libert und R. Dovaz, *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 16 (1955) 122.
41 K. Heyns, W. Walter und W. Heyde, *Z. Physiol. Chem.*, 304 (1956) 279.
42 T. Miettinen, Y. Ryhänen und H. Salomaa, *Ann. Med. Exptl. Biol. Fenniae (Helsinki)*, 35 (1957) 173.
43 M. Ishidate und T. Nambara, *Pharm. Bull. (Tokyo)*, 5 (1957) 515.
44 T. Momose *et al.*, *J. Pharm. Soc. Japan*, 78 (1958) 1064.
45 M. de Moncuit und L. Robert, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 17 (1959) 475.
46 M. Brulé, H. Garban und A. Amer, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 92 (1925) 1216.
47 C. Neuberg und E. Kretschmer, *Biochem. Z.*, 36 (1911) 15.
48 M. Lesnik und M. von Nencki, *Chem. Ber.*, 19 (1886) 1534.
49 W. Böttger, *Qualitative Analyse*, 4.–7. Auflage, Engelmann, Leipzig, 1925, S. 374
50 R. J. Smith, in N. E. Artz und E. M. Osman (Eds.), *Biochemistry of Glucuronic Acid*, Academic Press, New York, 1950, S. 7.
51 Lit. siehe Meyer–Jacobson (Eds.), *Lehrb. d. organ. Chemie*, Bd. II/1, de Gruyter, Berlin Leipzig, 1921, S. 414, Fussn. 3.
52 W. Wagner, *Anal. Chim. Acta*, 29 (1963), in press.

Reprinted from
Analytica Chimica Acta
Elsevier Publishing Company, Amsterdam
Printed in The Netherlands

STUDIEN ÜBER DIE NAPHTHORESORCIN-REAKTION VON TOLLENS

II. ZUR BESTIMMUNG VON FREIER URONSAURE NEBEN URONOSIDEN, POLYURONOSIDEN UND NEBEN ANDEREN KOHLENHYDRATEN

WALDEMAR WAGNER

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen (Deutschland)

(Eingegangen den 20. Januar, 1963)

Fast die Hälfte aller bekannten Polysaccharide enthält Uronsäure-Einheiten[1]. Diese sind aber auch Bestandteile natürlicher niedermolekularer Verbindungen, so mancher pflanzlicher Glykoside und Saponine, und vor allem der ausserordentlich wichtigen Gruppe der „Glukuronsäurepaarlinge", welche in den Körperflüssigkeiten der Säugetiere, besonders im Harn, aufgefunden werden.

Bis vor ungefähr einem Jahrzehnt war man allgemein der Ansicht, dass freie Uronsäuren in der Natur nicht vorkämen, nicht zuletzt deswegen, weil es an einer einfachen Nachweismöglichkeit derselben neben den gebundenen Uronsäuren mangelte. So berichten *z.B.* ARTZ UND OSMAN in ihrer Monographie[2a] über die Biochemie der Glukuronsäure: "Glucuronic acid is not known to occur free in nature". Neuere Arbeiten australischer Forscher[3] haben jedoch gezeigt, dass bei einer ganzen Reihe von Beuteltieren freie Glukuronsäure als normaler Harnbestandteil auftritt.

In einigen Fällen wurde auch ein Ausstoss von freier Glukuronsäure nach Gaben von Chemikalien beobachtet. Verabfolgt man *z.B.* Veronal an Ratten oder Meerschweinchen, so tritt im Harn dieser Tiere neben der unveränderten Substanz noch freie Glukuronsäure auf, bei den Ratten ausserdem in vermehrtem Umfang Askorbinsäure[4]. Nach Eingabe von Anilin, *o*-Anisidin, *p*-Anisidin, *p*-Phenetidin oder Phenacetin konnten aus dem Harn von Kaninchen neben verschiedenen Paarlingen ohne vorherige Hydrolyse *z.T.* beträchtliche Mengen freier Uronsäure als schwerlöslicher *p*-Toluidin-Ammoniumglukuronat-Komplex isoliert werden, wobei allerdings die Möglichkeit offenbleibt, dass es sich um ein äusserst labiles Glukuronid gehandelt hat[5].

Unkonjugierte Glukuronsäure erscheint im menschlichen oder tierischen Harn, wenn sie peroral oder parenteral in grösseren Mengen verabreicht wird. Solche Versuche dienen einmal zur Aufhellung des Schicksals der Uronsäure im Organismus[6-11], zum anderen stellen sie ein Hilfsmittel in der Differentialdiagnose von Leberkrankheiten dar[9,12,13] (sog. „Leberfunktionsprobe"). Berichte amerikanischer Autoren[14,15], wonach sich Gaben von Glukuron per os über längere Zeiträume hinweg bei rheumatischen Erkrankungen günstig ausgewirkt hätten, konnten von anderer Seite nicht bestätigt werden[9,11,16]. Dagegen sprechen viele Fälle von Hyper-bilirubinämie und Erythroblastose der Neugeborenen auf eine Behandlung mit Glukuron günstig an[17].

Das Auftreten von freier Galakturonsäure ist im Pflanzenreich zu erwarten, wo sie den wesentlichsten Baustein der Pektinstoffe in Rüben, Stengeln, Früchten, *usw.* bildet. Sie scheint sich jedoch unter natürlichen Bedingungen nirgends in grösseren Mengen anzuhäufen[18], sodass ihr Vorkommen lange Zeit umstritten war[19].

All diese teils natürlichen, teils unter bestimmten Versuchsbedingungen erzielten Vorkommen von freien Uronsäuren neben solchen im gebundenen Zustand und neben anderen Zuckern lassen ein Verfahren wünschenswert erscheinen, das die Erkennung und Bestimmung der freien Säuren in den genannten Fällen gestattet.

DIE GRUNDLAGEN DES NEUEN QUANTITATIVEN VERFAHRENS

Wahl der Säure

Den Ausführungen in Teil I dieser Studien[20] ist zu entnehmen, dass die Mineralsäure bei der TOLLENSschen Naphthoresorcin-(NR)-Reaktion eine erwünschte Doppelrolle spielt (*1* und *2*) zu der sich unvorteilhafterweise noch eine dritte Funktion (*3*) gestellt, nämlich: (*1*) Katalyse der hydrolytischen Spaltung von Oligo- und Polyuronosiden; (*2*) Kondensation von Uronsäure und NR zum Farbstoff; (*3*) Decarboxylierung der freigesetzten Uronsäure-Einheiten bei höherer Temperatur.

Unsere Untersuchungen gingen nun von folgender Überlegung aus: In der bislang ausschliesslich verwendeten mehr oder weniger starken Salzsäure bzw. Schwefelsäure sind die drei genannten Funktionen untrennbar verbunden; sie könnten jedoch bei anderen Säuren als nicht notwendig voneinander abhängige Eigenschaften durchaus in unterschiedlichem Masse vertreten sein. Diese Vermutung liess sich in mannigfachen Versuchen zunächst nicht bestätigen; endlich hat sich aber gezeigt, dass die Mineralsäure hinsichtlich Funktion (*2*) in geradezu idealer Weise durch *conc. Phosphorsäure* ersetzt werden kann, wenn zugleich der Wassergehalt des Reaktionsmediums durch wassermischbare organische Zusätze passend eingestellt wird. Die Kondensation geht dann so glatt vonstatten, dass selbst bei verhältnismässig tiefer Temperatur (70°) kurze Reaktionszeiten möglich sind. Unter diesen milden Bedingungen ist CO_2-Abspaltung nicht zu befürchten; eine bei allen bisherigen Verfahren gegebene Fehlerquelle (*vgl.*[20]) wird somit ausgeschaltet. Da die hydrolytische Aktivität der Phosphorsäure nur einen Bruchteil von derjenigen einer Mineralsäure beträgt, gelingt es nunmehr, mit Hilfe der NR-Reaktion freie Uronsäure neben bestimmten Uronosiden quantitativ zu erfassen.

Wahl des organischen Zusatzes

Nachdem bei der Mehrzahl aller bisher ausgearbeiteten quantitativen Verfahren keine maximale Farbstoffbildung angestrebt wird und Nebenreaktionen verschiedener Art eine beträchtliche Rolle spielen, ist zur Erzielung brauchbarer Werte die Zugabe einer genau bemessenen NR-Menge unerlässlich. Zur Dosierung kommt praktisch nur eine NR-Lösung in Betracht, wofür als Lösungsmittel bislang meist Wasser, vereinzelt auch Alkohol oder Aceton Verwendung fand. Die damit verbundenen Nachteile und Fehlerquellen wurden bereits geschildert[20].

Wir haben als Lösungsmittel für das NR reinsten *Eisessig* gewählt, der gegenüber den anderen Solventien ein relativ stabiles Reagens liefert. Zwar machen sich hier ebenfalls Alterungsvorgänge bemerkbar; sie verlaufen jedoch sehr viel langsamer als in der wässrigen Lösung, und die gebildeten Farbstoffe sind auch qualitativ verschie-

den[20]. Die Verwendung von Eisessig hat ferner zur Folge, dass der Wasseranteil des Reaktionsgemisches in weiten Grenzen beliebig eingestellt, vor allem stark herabgedrückt werden kann, was die Kondensation unter dem Einfluss der Säure ausserordentlich erleichtert. Das Verhältnis von 1 Teil Wasser auf 7 Teile Reaktionsgemisch (≡ 14.3% Wassergehalt) hat sich gut bewährt. Erst auf diese Weise wurde es möglich, selbst unter Einsatz der mittelstarken Phosphorsäure eine Reaktionstemperatur von 70° und eine Reaktionszeit von 75 Min (Glukuronsäure) bzw. 30 Min (Galakturonsäure) einzuhalten. Ein weiterer wesentlicher Vorteil liegt darin, dass in der überwiegend aus Eisessig bestehenden Phase die gebildeten Farbstoffe sowie die Produkte der Nebenreaktionen sämtlich in Lösung bleiben, während sie bei allen bisherigen, stets im wässrigen System arbeitenden Verfahren ganz oder doch zum grössten Teil abgeschieden werden. Damit entfallen von vorneherein alle Analysenfehler, die GRAUER UND NEUBERG[21] durch „Adsorption des NR-Pigmentes an typische Verunreinigungen" sowie durch Verharzung des Farbstoffes erklären[20]. Auch die glatte Extraktion mit Toluol ist auf das Vorliegen von *gelösten* Reaktionsprodukten zurückzuführen.

Naphthoresorcin-Konzentration

Der Mindestgehalt des Reaktionsgemisches an NR wird durch drei verschiedenartige Umstände bestimmt, nämlich: (*1*) durch die gegenseitige Abhängigkeit von (a) Reaktionstemperatur, (b) Dauer des Erhitzens und (c) NR-Konzentration in dem Sinne, dass für die Erzielung eines vorgegebenen Ausfärbungsgrades diese Variablen nicht beliebig wählbar sind. (*2*) Weiter ist zu berücksichtigen, dass, wie schon ausgeführt, das NR infolge verschiedener Nebenreaktionen der gewünschten Umsetzung entzogen werden kann. (*3*) Ausserdem macht sich bei Reihenanalysen noch der verhältnismässig hohe Preis des reinen Präparates geltend.

Die Wahl der NR-Konzentration richtet sich nun nach den jeweiligen Erfordernissen. Nachdem es uns zur Verringerung der hydrolytischen Freisetzung von gebundenen Uronsäuren auf möglichst niedrige Temperatur und kurze Erhitzungszeit ankam, haben wir die NR-Menge als abhängige Variable behandelt. 4 ml einer 0.2%-igen Lösung erwiesen sich unter den gewählten Reaktionsbedingungen als ausreichend. Das bedeutet gegenüber der quantitativ erfassbaren Höchstmenge von 100 μg Uronsäure einen ungefähr 20-fachen Reagensüberschuss, der selbst beträchtliche Verluste durch Nebenreaktionen ausgleichen dürfte. Auch der NR-Verbrauch hält sich in mässigen Grenzen.

Uronsäuregehalt

Der Gehalt der Probelösung an Uronsäure soll für die quantitative Bestimmung zwischen 20 und 100 μg pro ml liegen. Konzentriertere Lösungen sind entsprechend zu verdünnen, verdünntere unter geeigneten Vorsichtsmassnahmen anzureichern.

Regelung der Reaktionstemperatur

Die NR-Reaktion gehorcht im allgemeinen der VAN 'T HOFFschen Regel: Solange nicht das Gebiet maximaler Farbstoffbildung erreicht und überschüssiges NR zugegen ist, steigt unter sonst gleichen Bedingungen die Extinktion für je 10° Temperaturerhöhung auf etwa das Doppelte. Daraus erhellt, dass der räumlichen und zeitlichen

Konstanthaltung der Temperatur während des Erhitzens ganz besondere Sorgfalt gewidmet werden muss, wenn man vergleichbare Werte erhalten will. Für die quantitative Bestimmung ist ein guter Thermostat unbedingte Voraussetzung; er kann mit Wasser gefüllt werden, da bis etwa 80° die Verdampfungsverluste in erträglichen Grenzen bleiben.

Konstanthaltung des Volumens

Schwer verständlich erscheint es, dass bei fast allen bislang angegebenen Bestimmungsverfahren auf die Konstanthaltung der Masse des Reaktionsgemisches während des Erhitzens nicht geachtet wurde. Selbst die sorgfältige Studie von FISHMAN UND GREEN[22] macht hier keine Ausnahme.

Nach unseren Erfahrungen ergeben sich in offenen Gefässen unterschiedliche, *z.T.* beträchtliche Verdampfungsverluste (zumal beim Arbeiten im siedenden Wasserbad), wodurch die Ergebnisse stark verfälscht werden können. Nachdem der Dampfdruck unseres Reaktionsgemisches bei 70° nur gering ist, lässt sich durch Verschluss der Reagensgläser mit einem Gummistopfen die Verdampfung der niedriger siedenden Anteile völlig verhindern.

Wahl des Extraktionsmittels

Obwohl NEUBERG UND SANEYOSHI schon 1911 zum Ausschüttelen des Uronsäurefarbstoffes statt Äther das weitaus selektiver wirkende Benzol empfohlen haben, wurde in der Folgezeit noch vielfach nach der ursprünglichen Angabe von TOLLENS gearbeitet. In der quantitativen Methodik hat sich die Benzolextraktion überhaupt nicht eingebürgert. Der Grund ist wohl darin zu suchen, dass mit Benzol aus dem wässrig-mineralsauren Gemisch offenbar kein quantitativer Auszug des Farbstoffes zu erhalten ist, sei es durch Hemmung des Phasenüberganges, sei es durch einen ungünstigen Verteilungsquotienten. Über vergebliche Versuche in dieser Hinsicht berichten KAPP[29] sowie RATISH UND BULLOWA[24]; nur MEYER *et al.*[25] empfehlen gerade umgekehrt die Verwendung von Benzol und finden Äther ganz unbrauchbar, wenn reine Uronsäuren bzw. deren Salze vorliegen. Allerdings sind in der Mitteilung dieser Autoren weder Beleganalysen noch Fehlergrenzen angegeben, ja nicht einmal der Arbeitsgang wird beschrieben, sodass eine vergleichende Beurteilung unmöglich ist.

FISHMAN *et al.*[26,22] sowie neuerdings eine Reihe japanischer Autoren[27,28,12] haben das Ausschütteln mit Alkohol + Toluol vorgenommen; allein, durch den Zusatz von Alkohol wird die Selektivität des eigentlichen Extraktionsmittels ungünstig beeinflusst, wie FASHENA UND STIFF am Beispiel der Pentosenfarbstoffe aufzeigen konnten[29].

Zur Extraktion des gelösten Uronsäurefarbstoffes aus dem Reaktionsgemisch haben wir *reines Toluol* herangezogen. Es bietet anstelle der bislang üblichen Solventien (Äther, Alkohol + Äther, Amylalkohol, Benzylalkohol, Butylacetat, Chloroform) folgende wesentliche Vorteile:

(*a*) Leichte, vollständige und weitgehend selektive Aufnahme des Uronsäurefarbstoffes. Alle Verbesserungen des qualitativen Nachweises, die mit der Wahl eines aromatischen Kohlenwasserstoffes für die Extraktion verbunden sind, werden nun uneingeschränkt auch der quantitativen Analyse dienstbar gemacht.

(*b*) Sehr geringe Verdampfungsverluste infolge des relativ hohen Siedepunktes von Toluol, besonders im Vergleich zu dem bisher zumeist gebrauchten Äther.

(*c*) Ausgezeichnete Trennung der beiden Phasen, wenn man, wie vorgeschlagen,

durch Rotation in schräger Lage extrahiert. Es erübrigt sich die Verwendung eines Scheidetrichters.

(*d*) Vermeidung der Filtration des Extraktes, da sich alle unlöslichen Partikel, sofern solche überhaupt gebildet werden, in der Grenzschicht zwischen den beiden flüssigen Phasen ansammeln und beim Abheben des Toluols mit einer Pipette nicht stören.

(*e*) Fortfall der Trocknung mit einem Trockenmittel; denn die Toluolphase ist bereits vollkommen klar.

Volumen des Toluols

Die Toluolmenge wurde so bemessen, dass ein ausreichendes Volumen zur Beschikkung der Mikroküvetten des Spektralphotometers einschliesslich eines geringen Überschusses zur Verfügung steht, welcher die bequeme Abnahme der Toluolphase mittels Pipette und Gummiball ermöglicht. Das Toluol nimmt während des Extraktionsvorganges unter gleichen äusseren Bedingungen eine stets gleichbleibende Menge Essigsäure auf; so wird bei Zugabe von 2.00 ml Toluol eine Toluol-Essigsäure-Phase von 2.60 ml gebildet. Der zunächst in einem Volumen von 7.00 ml verteilte Farbstoff ist also schliesslich in 2.60 ml enthalten, und es ergibt sich demnach der günstige Anreicherungsfaktor von 2.7.

Nachdem die Konstanz des Volumens der Toluol–Essigsäure-Phase durch die ganze Versuchsreihe gewährleistet ist, erübrigt sich auch noch die Verwendung von Messkolben, sodass der gesamte Arbeitsgang bis zur Extinktionsmessung in *einem* Gefäss, und zwar einem Reagensglas durchgeführt werden kann.

Extraktionsweise

Zur Überführung des Farbstoffes von der wässrigen in die organischen Phase wurde bisher durchweg so verfahren, dass das verschlossene Gefäss kurze Zeit kräftig geschüttelt wurde. Die Folgen sind häufig eine schlechte Entmischung der Phasen sowie feinste Suspensionen wässriger Tröpfchen in der organischen Schicht, die nach der Abtrennung erst mit einem Trockenmittel geklärt werden muss.

Unter unseren Versuchsbedingungen genügt es für eine quantitative Extraktion des Farbstoffes, wenn die Reagensgläser in schräger Lage (Vergrösserung der Phasengrenzfläche) viermal je 45 Sek von Hand um die Längsachse gedreht werden. Die Toluolphase bleibt dabei klar und setzt sich sofort vollkommen scharf ab.

ARBEITSVORSCHRIFTEN

Bestimmung von Glukuronsäure

Reagentien: Conc. *o*-Phosphorsäure ($D = 1.70$) p.a., Naphthoresorcin p.a. (Hoffmann, La Roche), Eisessig (99–100%) p.a., Toluol p.a.

In graduierte, mit Gummistopfen zu verschliessende Reagensgläser von gleichen Abmessungen (Anm. *1*) pipettiert man je 1.00 ml der Probelösung, enthaltend 20–100 μg freie Uronsäure. Dann gibt man aus einer Bürette je 2.00 ml conc. Phosphorsäure in langsamer, stets gleichmässiger Tropfenfolge hinzu und vermischt sofort. Schliesslich wird (Pipette) mit je 4.00 ml einer 0.2%igen Naphthoresorcinlösung in Eisessig (Anm. *2*) überschichtet. Erst nach Beendigung dieses Arbeitsganges darf in unmittelbarer Abfolge der Inhalt jedes Glases sorgfältig gemischt werden (Anm. *3*). Nun werden die verschlossenen Gläser 75 Min lang im Thermostaten (Anm. *4*) auf 70° erwärmt. Nach dem Erkalten gibt man mit Pipette je 2.00 ml Toluol zu, verschliesst

wiederum und stellt dann die Serie gleichzeitig in Eiswasser. Etwa 15 Min später beginnt man mit der Extraktion, indem man Glas um Glas aus dem Wasser nimmt und 45 Sek lang in schräger Lage um seine Achse dreht. Als Halterung dient zweckmässig ein starkwandiges Zentrifugenglas von passender Weite. Die Temperatursteigerung des Inhalts durch die Handwärme ist möglichst gering zu halten; man stellt sofort wieder ins Eiswasser zurück.

Wenn dieser Extraktionsteilschritt viermal die ganze Serie durchlaufen hat, werden die Reagensgläser herausgenommen. Man wartet ab, bis der Inhalt auf Raumtemperatur gekommen ist und liest dann das Volumen der klaren Toluol–Essigsäure-Phase ab. Letztere wird mittels Pipette und Gummiball abgehoben und zur Extinktionsmessung bei 570 mμ in 1 cm-Mikroküvetten eingefüllt (Anm. 5).

Zur Aufstellung der Eichkurve werden drei Eichwerte mit 22, 44 und 88 μg Glukuron/ml ($\equiv$ 24.25, 48.5 und 97 μg Glukuronsäure/ml) in jeder Analysenserie mitgeführt, desgleichen ein Leerwert mit 1.00 ml Wasser.

Während des gesamten Arbeitsganges ist die Einwirkung starker Lichtquellen zu vermeiden!

Anm. 1. Wir haben Reagensgläser mit den Abmessungen 180 × 18 mm (*ca.* 45 ml Rauminhalt) verwendet, die eine 0.5 ml-Teilung besitzen.

Anm. 2. Am besten bereitet man die Lösung unmittelbar vor dem Gebrauch. Soll sie für einige Tage auf Vorrat hergestellt werden, so empfiehlt sich die Aufbewahrung in einer gut verschlossenen braunen Flasche bei Raumtemperatur (nicht im Kühlschrank).

Anm. 3. Es dürfen keine Schlieren mehr zu erkennen sein!

Anm. 4. Der Thermostat weist in seinem Deckel eine der Höchstzahl der Reagensgläser pro Analysenserie entsprechende Anzahl von Bohrungen auf, durch welche die Gläser mit geringem Spielraum eingeführt werden können. Letztere werden in der gewünschten Eintauchtiefe durch eine übergezogene konische Gummidichtung festgehalten. Durch lebhaftes Rühren wird für raschen Temperaturausgleich gesorgt.

Anm. 5. Unsere Versuchsreihen wurden teils im Beckman Spektralphotometer DU, teils im Zeiss Gerät PMQ II durchgemessen.

Bestimmung von Galakturonsäure

Die quantitative Bestimmung der Galakturonsäure erfolgt in gleicher Weise wie bei der Glukuronsäure mit der einzigen Abweichung, dass zur Farbstoffbildung nur 30 Min auf 70° erhitzt wird. Die Eichwerte enthalten hier 24.25, 48.5 und 97 μg Galakturonsäure/ml.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Uronsäure ohne Zusätze

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen ist im Bereich von 20 bis 100 μg Uronsäure das LAMBERT–BEERsche Gesetz erfüllt. Die Abweichungen der einzelnen Messpunkte von der Eichgeraden liegen fast ausnahmslos unter 2%, in keinem Falle aber über 3%.

Wie bei vielen kolorimetrischen Methoden war es auch hier nicht möglich, eine für mehrere Versuchsreihen gültige, reproduzierbare Eichgerade aufzustellen. Worauf das zurückzuführen ist, konnte trotz sorgfältiger Beobachtung aller die Reaktion be-

treffenden Umstände nicht eindeutig geklärt werden. Übereinstimmend mit diesen Erfahrungen betonen auch HOLLMANN UND WILLE[10] sowie FRETWURST UND AHLHELM[11], dass zur Erzielung höchstmöglicher Genauigkeit bei jeder Analysenserie neue Eichwerte mitgeführt werden müssen.

Uronsäure neben anderen Kohlenhydraten

Die Leistungsfähigkeit eines Analysenverfahrens für biochemische Zwecke erweist sich nur zu einem geringen Teil bei seiner Anwendung auf reine Lösungen des betr. Stoffes. Nachdem das biologische Ausgangsmaterial meist eine Unzahl der verschiedensten Begleitsubstanzen enthält und eine Abtrennung derselben oft methodisch oder vom Arbeitsaufwand her gesehen nur unvollkommen oder überhaupt nicht möglich ist, muss man den Störungen durch Begleitstoffe ganz besondere Aufmerksamkeit widmen.

Hinsichtlich der Bestimmung von Uronsäuren mittels der TOLLENSschen NR-Reaktion sind solche Untersuchungen nicht eben zahlreich. Viele Varianten wurden von ihren Autoren überhaupt nicht auf Fehler durch die Anwesenheit anderer Kohlenhydrate überprüft, obwohl aus qualitativen Arbeiten längst bekannt war, dass sie zu erheblichen Fehlschlüssen Veranlassung geben können. Nachdem bisher zur quantitativen Extraktion des Farbstoffes ausschliesslich unspezifische bzw. wenig selektive Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische Verwendung gefunden haben, darf es nicht wundernehmen, wenn bei Gegenwart anderer Saccharide beträchtliche Abweichungen festgestellt wurden. So haben HANSON *et al.*[30] den Einfluss von Glukose auf die Glukuronsäurebestimmung untersucht und folgende Tabelle (I) erhalten (Ausschütteln des Reaktionsgemisches mit Amylalkohol).

TABELLE I

Zugegebene Menge von		*Gefundene Menge von Glukuronsäure* (μg)
Glukuronsäure[a] (μg)	*Glukose* (μg)	
53.6	0	54.0
53.6	18	56.5
53.6	36	57.0
53.6	54	61.0

[a] In Form von L-Menthylglukuronosid.

Die Anwesenheit einer äquivalenten Menge Glukose bedingt also einen Fehler von + 13.8%!

Ausführlichere Untersuchungen über störende Einflüsse der übrigen Zucker stammen von STARY UND YUVANIDIS[31] (Ausschütteln des Reaktionsgemisches mit Alkohol + Äther). Fructose stört demnach am stärksten, eine Erfahrung, die man auch bei anderen Farbreaktionen der Kohlenhydrate immer wieder macht; 100 μg Fructose weisen ~ 16% der Extinktion von 100 μg Glukuronsäure auf! Es folgen Ribose, dann Arabinose, endlich die Aldohexosen Glukose, Mannose und Galaktose. Für 100 μg Glukose beträgt die Extinktion immer noch ~ 4% von derjenigen der gleichen Glukuronsäuremenge. STARY UND YUVANIDIS haben ferner das Verhalten der häufigsten Aminosäuren überprüft und gefunden, dass „diese sowie ihre Gemische auch bei sehr hoher Konzentration . . . völlig farblos blieben." Das steht im Einklang mit unserer Erfahrung, wonach zwecks Aufspaltung von Glukuronosiden zugesetzte β-Glukuroni-

TABELLE II

EINFLUSS VON GLUKOSE UND FRUCTOSE AUF DIE BESTIMMUNG DER GLUKURONSÄURE

Glukuron gegeben (μg)	*Zusatz von*		*Molverhältn. Hexose:Glukuron*	*Extinktion (E)*	*Glukuron gefunden (μg)*	*Abweichung (%)*
	Glukose (μg)	*Fructose (μg)*				
22.0	—	—	—	0.076	—	—
44.0	—	—	—	0.154	—	—
22.0	225	—	10 : 1	0.0775	22.4	+ 2.0
22.0	450	—	20 : 1	0.0805	23.3	+ 5.9
44.0	450	—	10 : 1	0.1555	44.4	+ 1.0
22.0	—	—	—	0.0735	—	—
44.0	—	—	—	0.1485	—	—
22.0	225	—	10 : 1	0.076	22.7	+ 3.4
22.0	450	—	20 : 1	0.080	24.0	+ 8.9
44.0	450	—	10 : 1	0.1515	44.9	+ 2.0
22.0	—	—	—	0.0695	—	—
44.0	—	—	—	0.1425	—	—
22.0	—	45.0	2 : 1	0.070	22.2	+ 0.7
22.0	—	90.0	4 : 1	0.0745	23.6	+ 7.2
44.0	—	90.0	2 : 1	0.1435	44.3	+ 0.7
22.0	—	—	—	0.070	—	—
44.0	—	—	—	0.1445	—	—
17.6	—	54.0	3 : 1	0.054	17.3	− 1.8
22.0	—	90.0	4 : 1	0.0725	22.8	+ 3.6
44.0	—	90.0	2 : 1	0.145	44.1	+ 0.3
22.0	—	—	—	0.070	—	—
44.0	—	—	—	0.144	—	—
22.0	—	45.0	2 : 1	0.0725	22.8	+ 3.6
22.0	—	90.0	4 : 1	0.076	23.9	+ 8.6
44.0	—	90.0	2 : 1	0.148	45.2	+ 2.8

TABELLE III

EINFLUSS VON GLUKOSE UND FRUCTOSE AUF DIE BESTIMMUNG DER GALAKTURONSÄURE

Galakturonsäure gegeben (μg)	*Zusatz von*		*Molverhältn. Hexose:Galakturonsäure*	*Extinktion (E)*	*Galakturonsäure gefunden (μg)*	*Abweichung (%)*
	Glukose (μg)	*Fructose (μg)*				
24.25	—	—	—	0.075	—	—
24.25	225	—	10 : 1	0.0745	24.1	−0.7
24.25	450	—	20 : 1	0.0735	23.8	−2.0
24.25	—	—	—	0.085	—	—
48.50	—	—	—	0.174	—	—
24.25	225	—	10 : 1	0.082	23.4	−3.5
24.25	450	—	20 : 1	0.0845	24.1	−0.6
48.50	450	—	10 : 1	0.168	46.9	−3.4
24.25	—	—	—	0.083	—	—
48.50	—	—	—	0.169	—	—
24.25	—	45.0	2 : 1	0.082	24.0	−1.2
24.25	—	90.0	4 : 1	0.085	24.8	+2.4
48.50	—	90.0	2 : 1	0.170	48.8	+0.6
24.25	—	—	—	0.080	—	—
48.50	—	—	—	0.1615	—	—
24.25	—	45.0	2 : 1	0.0795	24.1	−0.6
24.25	—	90.0	4 : 1	0.082	24.9	+2.5
48.50	—	90.0	2 : 1	0.1595	47.9	−1.2

dase zur Bestimmung der freigesetzten Uronsäure nicht abgetrennt zu werden braucht.

Ähnliche Verhältnisse treffen wir bei der Galakturonsäure an. KERTESZ[32] hat die Methode von RATISH UND BULLOWA[24] auf die Bestimmung von Galakturonsäure übertragen und bemerkt: "Small proportions of glucose and galactose do not seem to interfere; both arabinose and fructose in proportions exceeding the amount of galacturonic acid may completely destroy the reliability of the method".

ARTZ UND OSMAN[2c] äussern sich über die Fehlergrenze von Glukuronsäurebestimmungen im biologischen Material wie folgt: "The accuracy claimed for these methods is seldom better than $\pm 5\%$, and it is doubtful whether even this degree of accuracy is obtained consistently". DEICHMANN UND WITHERUP[33] haben gleichfalls für ihr Verfahren eine Fehlergrenze von 5% angegeben. Lassen wir demnach Abweichungen bis zu $\pm 5\%$ vom wahren Werte zu, so ermöglicht es das beschriebene Verfahren, Glukuronsäure noch neben der doppelten Menge Fructose oder der zehnfachen Menge Glukose quantitativ zu erfassen (Tabelle II). Bei der Galakturonsäure ist sogar die vierfache Menge Fructose oder die zwanzigfache Menge Glukose unerheblich (Tabelle III).

Uronsäure neben Uronosiden

Um das Verhalten der Glukuronsäure (und anderer Uronsäuren) im Organismus verfolgen zu können, ist ein Verfahren für die Bestimmung von freier neben gebundener Uronsäure im selben Substrat Voraussetzung[34].

Nähere Beschäftigung mit dieser Problematik lehrt zunächst, dass es sich hierbei um zwei methodisch recht ungleichwertige Teilprobleme handelt, je nachdem, ob die gebundene Uronsäure in Makromolekülen oder niedermolekularen Verbindungen enthalten ist.

Liegen als Begleiter hochmolekulare Polyuronoside (Chondroitin-schwefelsäure, Heparin, Hyaluronsäure, *usw.*) vor, so lässt sich durch einfache Massnahmen, *z.B.* eine Alkoholfällung, die Abtrennung von der monomeren Säure bewirken.

In weitaus den meisten Fällen wird aber die freie Uronsäure neben niedermolekularen Uronosiden zu bestimmen sein. Wenn man bedenkt, dass *z.B.* die Bindungspartner der Glukuronsäure in den Körperflüssigkeiten den verschiedensten Substanzklassen angehören und überdies mehrere Bindungstypen vorkommen, woraus sich stark unterschiedliche Eigenschaften der Paarlinge ergeben, so erscheint es begreiflich, dass den Bemühungen in dieser Richtung bisher recht bescheidene Erfolge gegenüberstehen. Im Schrifttum sind nähere Angaben nur zu den folgenden beiden Methoden zu finden:

(*1*) Entfernung der Glukuronoside durch Ätherextraktion. Dieses Verfahren diente ursprünglich zur Abtrennung von Glukuronsäurepaarlingen aus dem Harn von Versuchstieren in präparativem Massstab, wurde dann durch NEUBERG UND SCHEWKET[35] in die qualitative Analyse eingeführt und 1924 von QUICK[36] für die quantitative Bestimmung der Mentholglukuronsäure ausgearbeitet. LEVVY[37] hat 1948 die Extraktion mit Äther zur quantitativen Trennung von Mentholglukuronosid und freier Glukuronsäure vorgeschlagen. HEYNS UND KELCH[34] zeigten jedoch, dass dieses Verfahren nur bei leicht ätherlöslichen Glukuronosiden (wie Menthol- oder Borneol-glukuronsäure) zu brauchbaren Ergebnissen führt, in allen übrigen Fällen hingegen versagt.

(*2*) Fällung von freier Uronsäure als *p*-Toluidin-Komplex. SMITH UND WILLIAMS[5] fanden, dass freie Uronsäuren (dagegen nicht ihre Lactone) mit *p*-Toluidin in wässrig-alkoholischer Lösung auf Zusatz von etwas Ammoniak als schwerlösliche kristalline Komplexe der Zusammensetzung 2 *p*-Toluidin : 1 Ammonium-uronat ausfallen. In-

wieweit das auch für Uronoside zutrifft, wurde bisher nicht untersucht. Die Reaktion ermöglicht zwar halbquantitative Aussagen, wenn grössere Mengen an Uronsäuren vorliegen; ein genaues Verfahren lässt sich hierauf aber nicht aufbauen.

(3) Die Angabe bei HINSBERG UND LANG[38], dass von JARRIGE[39] eine Methode zur getrennten Bestimmung von freier Uronsäure beschrieben wurde, beruht auf einem Irrtum.

Demgegenüber gründet sich unser Vorschlag zur Bestimmung von freier neben gebundener Uronsäure auf die hydrolytische Resistenz gewisser Uronoside. Um den Anwendungsbereich des neuen Verfahrens überblicken zu können, muss folgendes vorausgeschickt werden.

Von den natürlich vorkommenden Oligo-uronosiden fällt der ganz überwiegende Teil unter die Klasse der sog. „Glukuronsäurepaarlinge". Ihr Name weist bereits auf den chemischen Aufbau hin: Es handelt sich um Verbindungen, die man sich aus einem Molekül Glukuronsäure und einem Molekül eines organischen Bausteines, der H an einem Hetero-Atom (O, N, S) gebunden enthält, durch Abspaltung von einem Molekül Wasser entstanden denken kann. Je nach dem Bindungstyp zwischen den beiden Komponenten sind vier Gruppen zu unterscheiden, die sich gegenüber hydrolytischen Einflüssen gänzlich verschieden verhalten.

(1) *Phenoläther-Typ.* Dieser stellt die glykosidische Verknüpfung eines Phenols mit dem C_1-Hydroxyl der Glukuronsäure dar. Zu diesem Typ gehört sowohl mengenmässig als auch der Zahl der Individuen nach der grösste Teil der im Säugetierkörper anzutreffenden Paarlinge. Die Phenoläther-gruppierung ist gegen Hydrolyse mit Säuren sehr widerstandsfähig, wenngleich von Fall zu Fall geringfügige Unterschiede sich geltend machen.

(2) *Alkoholäther-Typ.* Hier ist an der glykosidischen Bindung am C_1 eine alkoholische Hydroxylgruppe beteiligt. Dieser Typ umfasst mit wenigen Ausnahmen alle übrigen „gepaarten Uronsäuren". Bei den natürlich vorkommenden Vertretern ist zumeist ein sekundärer Alkohol beteiligt. Die hydrolytische Resistenz hängt von der Natur des alkoholischen Bindungspartners ab, ist aber stets viel geringer als beim Phenoläther-Typ.

(3) *Ester-Typ.* Die Glukuronsäure ist über C_1 esterartig mit der Carboxylgruppe einer (meist aromatischen) Säure verbunden. Eine solche Gruppierung setzt hydrolytischen Einwirkungen nur geringen Widerstand entgegen: Schon beim Kochen mit Wasser erfolgt rascher Zerfall in die Komponenten; desgleichen beim Stehen der schwach alkalischen Lösung bei Raumtemperatur. Paarlinge vom Ester-Typ spielen in den Körperflüssigkeiten normalerweise nur eine untergeordnete Rolle. Nach Gaben von bestimmten Arzneimitteln, wie *z.B.* Salicylsäure, erscheinen sie jedoch als eine mögliche Ausscheidungsform im Harn.

(4) *Amin-Typ.* Bei dieser eigenartigen Unterklasse, deren Konstitution noch nicht restlos gesichert erscheint, soll durch Wasseraustritt zwischen einer aromatischen Aminogruppe und dem Halbacetal-Hydroxyl der Glukuronsäure eine amin-artige Bindung zustande gekommen sein. Man vermutet, dass derartige Körper im Harn von Versuchstieren enthalten sind, die mit Anilin, Anisidin oder Phenetidin behandelt wurden. Ihre Isolierung scheitert an dem Umstand, dass sie ausserordentlich leicht hydrolysiert werden.

Diese Ausführungen machen deutlich, dass einem Verfahren zur getrennten Bestim-

TABELLE IV

EINFLUSS VON PHENOLPHTHALEIN-GLUKURONOSID (PPG) UND 8-HYDROXYCHINOLIN-GLUKURONOSID (OxG) AUF DIE BESTIMMUNG DER GLUKURONSÄURE

Glukuron gegeben (μg)	*Zusatz von*		*Molverhältn. Glukuronosid: Glukuron*	*Extinktion (E)*	*Glukuron gefunden (μg)*	*Abweichung (%)*
	PPG, ber. als Glukuron (μg)	*OxG, ber. als Glukuron (μg)*				
22.0	—	—	—	0.0695	—	—
44.0	—	—	—	0.142	—	—
22.0	88.0	—	4 : 1	0.0705	22.3	+1.4
44.0	88.0	—	2 : 1	0.141	43.7	−0.7
22.0	—	—	—	0.0675	—	—
44.0	—	—	—	0.137	—	—
22.0	132.0	—	6 : 1	0.068	22.2	+0.7
44.0	88.0	—	2 : 1	0.132	42.4	−3.6
22.0	—	—	—	0.0705	—	—
44.0	—	—	—	0.1445	—	—
22.0	88.0	—	4 : 1	0.0685	21.4	−2.8
22.0	132.0	—	6 : 1	0.075	23.4	+6.4
44.0	88.0	—	2 : 1	0.145	44.1	+0.3
22.0	—	—	—	0.064	—	—
22.0	88.0	—	4 : 1	0.065	22.4	+1.6
22.0	132.0	—	6 : 1	0.0675	23.2	+5.5
22.0	132.0	—	6 : 1	0.0645	22.2	+0.8
22.0	—	—	—	0.068	—	—
44.0	—	—	—	0.1365	—	—
22.0	—	88.0	4 : 1	0.0665	21.5	−2.2
22.0	—	132.0	6 : 1	0.067	21.7	−1.5
44.0	—	88.0	2 : 1	0.1385	44.7	+1.5
22.0	—	—	—	0.0575[a]	—	—
22.0	—	88.0	4 : 1	0.0575[a]	22.0	±0.0
22.0	—	132.0	6 : 1	0.058[a]	22.2	+0.9
22.0	—	132.0	6 : 1	0.057	21.8	−0.9

[a] Erhitzungsdauer 70 Min (statt 75 Min).

TABELLE V

EINFLUSS VON MENTHOL-GLUKURONOSID (MG) UND BORNEOL-GLUKURONOSID (BG) AUF DIE BESTIMMUNG DER GLUKURONSÄURE

Glukuron gegeben (μg)	*Zusatz von*		*Molverhältn. Glukuronosid: Glukuron*	*Extinktion (E)*	*Glukuron gefunden (μg)*	*Abweichung (%)*
	MG, ber. als Glukuron (μg)	*BG, ber. als Glukuron (μg)*				
22.0	—	—	—	0.072	—	—
44.0	—	—	—	0.146	—	—
22.0	22.0	—	1 : 1	0.0855	26.2	+19
44.0	44.0	—	1 : 1	0.175	52.8	+20
44.0	88.0	—	2 : 1	0.1945	58.5	+33
22.0	—	—	—	0.072	—	—
44.0	—	—	—	0.1445	—	—
22.0	—	22.0	1 : 1	0.090	27.5	+25
44.0	—	44.0	1 : 1	0.1785	54.3	+23.5
44.0	—	88.0	2 : 1	0.2065	62.9	+43

mung von freier neben gebundener Uronsäure, das sich auf das Hydrolyseverhalten der Uronoside stützt, prinzipielle Grenzen gezogen sind.

Unter Bedingungen, wie sie bereits den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Versuchsreihen zugrundeliegen, ist die Aufspaltung der Glukuronoside mit Phenoläther-gruppierung so geringfügig, dass eine quantitative Bestimmung von freier neben derartig gebundener Uronsäure bis etwa zur fünffachen molaren Menge der letzteren möglich wird (Tabelle IV). Paarlinge vom Ester-Typ und vom Amin-Typ werden sich hingegen selbst unter den schonendsten Kondensationsbedingungen wie freie Glukuronsäure verhalten; aber auch diejenigen vom Alkoholäther-Typ können noch in beträchtlichem Ausmass hydrolysiert werden (Tabelle V).

Dennoch bedeutet dieser Umstand keine wesentliche Einschränkung der Verwendbarkeit des geschilderten Verfahrens für Reihenanalysen zur Erforschung des Glukuronsäurestoffwechsels bzw. zu Leberfunktionsprüfungen beim Menschen, und zwar aus den folgenden Gründen:

(*1*) Die unter normalen Verhältnissen im Harn ausgeschiedenen Glukuronsäurepaarlinge sind, wie gesagt, mengenmässig ganz überwiegend Verbindungen mit Phenoläther-gruppierung. Der Amin-Typ kommt praktisch nicht vor. Bei Ausschluss von Medikamenten und Drogen treten Uronoside mit Alkoholäther-bindung nur in Form der quantitativ stark zurücktretenden[40] Gruppe der Steroidkonjugate, solche mit Ester-bindung wohl nur als Bilirubin-glukuronoside in Erscheinung.

(*2*) Liegen in Sonderfällen Uronoside vom Alkoholäther-Typ in grösserer Menge vor, so lässt sich manchmal eine (zumindest teilweise) Abtrennung derselben nach Levvy mit Äther[37] erreichen. Vielfach führt auch eine Differenzbestimmung gemäss

Gesamtglukuronsäure — gebundene Glukuronsäure = freie Glukuronsäure

zum Ziel, wobei die Gesamtglukuronsäure nach einem der bisher gebräuchlichen Verfahren mit Mineralsäure, die gebundene Glukuronsäure nach Fishman und Green[22] ermittelt wird.

Den Herren Dr. Krüll und Dr. Schlosshauer von der Schering AG, Berlin, bin ich für eine grosszügige Spende von Chemikalien sehr zu Dank verpflichtet.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch wesentliche Umgestaltungen der Tollensschen Naphthoresorcin-Reaktion, insbesondere: (*a*) Ersatz der Mineralsäure durch conc. Phosphorsäure; (*b*) Verwendung einer Lösung von Naphthoresorcin in Eisessig statt in Wasser; (*c*) Extraktion des gebildeten Farbstoffes mit Toluol anstelle anderer unspezifischer Lösungsmittel, wurde ein Mikrobestimmungsverfahren für freie Uronsäuren ausgearbeitet, das einige Fehlerquellen in der bisherigen Methodik prinzipiell vermeidet.

Das Verfahren ermöglicht eine einfache Bestimmung von freier Glukuronsäure neben Glukuronosiden vom Phenoläther-Typ, sofern deren molares Verhältnis einen bestimmten Grenzwert (~ 1 : 5) nicht unterschreitet. Es ergibt ferner zuverlässige Werte auch bei Anwesenheit *z.T.* beträchtlicher Mengen anderer Kohlenhydrate, wie am Beispiel der Glukose und Fructose gezeigt wird.

SUMMARY

A micro determination for free uronic acids based on Tollens' reaction is proposed. Sources of error in earlier methods are avoided by the use of phosphoric acid, a reagent solution in glacial acetic acid, and extraction of the dye with toluene. Free glucuronic acid can be determined in presence of glucuronosides of the phenol ether type up to molar ratios of *ca.* 1 : 5. Reliable results can also be obtained in the presence of other carbohydrates.

RÉSUMÉ

Une méthode, basée sur la réaction de Tollens, est proposée pour le microdosage des acides uro-

niques libres. Les causes d'erreurs des méthodes précédentes sont évitées par l'emploi d'acide phosphorique et d'une solution du réactif dans l'acide acétique glacial, et par extraction du colorant dans le toluène. L'acide glucuronique libre peut être dosé en présence de glucuronosides du type phénol–éther, et également en présence d'autres hydrates de carbone.

LITERATUR

1 R. L. WHISTLER UND W. M. CORBETT, in W. PIGMAN (Ed.), *The Carbohydrates*, Academic Press, New York, 1957, S. 648.
2 N. E. ARTZ UND E. M. OSMAN, *Biochemistry of Glucuronic Acid*. Academic Press, New York, 1950, a = S.13, b = S.7 f, c = S.8.
3 N. T. HINKS, *Australian J. Sci.*, 18 (1956) 198; N. T. HINKS UND A. BOLLIGER, *Australian J. Sci.*, 19 (1957) 228; *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, 35 (1957) 37.
4 J. J. BURNS, C. EVANS UND N. TROUSOF, *J. Biol. Chem.*, 227 (1957) 785.
5 J. N. SMITH UND R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.*, 44 (1949) 239, 242, 250.
6 W. H. FISHMAN *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 30 (1951) 685.
7 M. A. PACKHAM UND G. C. BUTLER, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 349.
8 J. F. DOUGLAS UND C. G. KING, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 187; 203 (1953) 889.
9 H. SÜDHOF, *Z. Physiol. Chem.*, 290 (1952) 72; 296 (1954) 267; *Deut. Arch. Klin. Med.*, 201 (1954) 89; H. SÜDHOF UND P. DJURANOVIČ, *Klin. Wochschr.*, 31 (1953) 866.
10 S. HOLLMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 297 (1954) 74; 298 (1954) 77; S. HOLLMANN UND E. WILLE, *Z. Physiol. Chem.*, 290 (1952) 91.
11 F. FRETWURST UND H. A. AHLHELM, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, 217 (1953) 382.
12 Y. YOKOE, *Sapporo Med. J.*, 11 (1957) 149.
13 T. WEGMANN UND J. MAROGG, *Schweiz. Med. Wochschr.*, 89 (1959) 345; J. MAROGG UND T. WEGMANN, *Deut. Med. Wochschr.*, 84 (1959) 1526.
14 E. A. PETERMAN, *Lancet*, 67 (1947) 451.
15 J. H. HODAS, H. BRANDON UND J. F. MALONEY, *Lancet*, 69 (1949) 385.
16 A. N. RUGGIE *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.*, 38 (1951) 945.
17 S. DANOFF *et al.*, *Science*, 127 (1958) 759.
18 J. H. MCCLENDON, C. W. WOODMANSEE UND G. F. SOMERS, *Plant Physiol.*, 34 (1959) 389.
19 F. A. HENGLEIN, in W. RUHLAND (Ed.), *Handb. d. Pflanzenphysiologie*, Bd. VI, Springer-Verlag, Berlin, 1958, S. 411.
20 W. WAGNER, *Anal. Chim. Acta*, 29 (1963) 182.
21 A. GRAUER UND C. NEUBERG, *Anal. Chim. Acta*, 8 (1953) 422.
22 W. H. FISHMAN UND S. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 215 (1955) 527.
23 E. M. KAPP, *J. Biol. Chem.*, 134 (1940) 143.
24 H. D. RATISH UND J. G. M. BULLOWA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2 (1943) 381.
25 K. MEYER, H. S. BLOCH UND E. CHAFFEE, *Federation Proc.*, 1 (1942) 125.
26 W. H. FISHMAN *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 30 (1951) 685.
27 M. ISHIDATE UND T. NAMBARA, *Pharm. Bull. (Tokyo)*, 5 (1957) 515.
28 M. AKASHI, *Fukuoka Med. J.*, 48 (1957) 2112.
29 G. J. FASHENA UND H. A. STIFF, *J. Biol. Chem.*, 137 (1941) 21.
30 S. W. F. HANSON, G. T. MILLS UND R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.*, 38 (1944) 274.
31 Z. STARY UND M. YUVANIDIS, *Biochem. Z.*, 324 (1953) 206.
32 Z. I. KERTESZ, *The Pectic Substances*, Interscience, New York, 1951, S. 41.
33 W. B. DEICHMANN UND S. WITHERUP, *Arch. Biochem. Biophys.*, 7 (1945) 401.
34 K. HEYNS UND C. KELCH, *Z. Anal. Chem.*, 139 (1953) 339.
35 C. NEUBERG UND O. SCHEWKET, *Biochem. Z.*, 44 (1912) 502; O. SCHEWKET, *Biochem. Z.*, 55 (1913) 4.
36 A. J. QUICK, *J. Biol. Chem.*, 61 (1924) 667.
37 G. A. LEVVY, *Biochem. J.*, 42 (1948) 2.
38 K. HINSBERG UND K. LANG, *Medizinische Chemie*, 3. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, 1957, S. 411.
39 P. JARRIGE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 32 (1950) 1038.
40 R. S. TEAGUE, *Adv. Carbohydrate Chem.*, 9 (1954) 185.

L E B E N S L A U F

Am 28.Mai 1928 wurde ich, Waldemar Leonhard W a g n e r, als erstes Kind des damaligen Gend.-Oberwachtmeisters Johann Wagner und seiner Ehefrau Marie, geb. Engelhardt zu Stein b.Nbg. geboren. Vom April 1934 ab besuchte ich die Volksschule in Cadolzburg b.Fürth und Schwabach. Im April 1938 trat ich in die Oberschule in Schwabach ein; mit der 6.Klasse wechselte ich (Sept. 1943) an die Oberschule a.d. Wölckernstraße in Nürnberg über. Von Anfang Jan. 1944 bis Ende Jan. 1945 war ich als Luftwaffenhelfer eingezogen; ich erhielt Betreuungsunterricht an Schulen in Nürnberg, Ansbach und Günzburg/Donau. In den ersten Apriltagen 1945 habe ich die Reifeprüfung an der Oberschule a.d. Wölckernstraße in Nürnberg abgelegt. Nach vorübergehender Tätigkeit als landwirtschaftlicher Hilfsarbeiter, Gastschüler an einem Vorsemesterkurs, Studierender an der Lehrerbildungsanstalt Schwabach, Verwaltungsangestellter und Finanzanwärter bezog ich mit Beginn des Wintersem. 1950/51 die Universität Erlangen, um Chemie zu studieren. Am 27.Nov. 1953 habe ich hier die Diplomchemiker-Vorprüfung, am 1.März 1956 die Diplomchemiker-Hauptprüfung abgelegt, und nach Abschluß der Diplomarbeit wurde mir am 14.März 1958 das Diplomzeugnis ausgehändigt. Seit Febr. 1958 bin ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Erlangen tätig, wo ich vorliegende Arbeit in der Zeit vom Nov. 1960 bis Febr. 1961 und vom Mai 1961 bis April 1962 ausgeführt habe.